

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ТЕТРАМЕРА ХЛОРОФИЛЛА В ВОДОРАСТВОРИМОМ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩЕМ БЕЛКЕ BoWSCP

© 2023 Д.А. Черепанов^{1,2*}, К.В. Неверов^{3,4}, Ю.Н. Обухов³, Ю.В. Малеева⁴,
Ф.Е. Гостев¹, И.В. Шелаев^{1,2}, А.В. Айбуш¹, М.С. Крицкий³, В.А. Надточенко^{1,5*}

¹ ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tscherepanov@gmail.com

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

³ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119017 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119992 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119992 Москва, Россия; электронная почта: nadtochenko@gmail.com

Поступила в редакцию 22.06.2023

После доработки 22.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» измерена абсорбционная динамика хлорофилла *a* в симметричном тетрамерном комплексе водорастворимого хлорофилл-связывающего белка BoWSCP в диапазоне от 400 до 750 нм с временным разрешением 20 фс–200 пс. При возбуждении BoWSCP в области полосы Core на длине волны 430 нм наблюдалась безызлучательная внутримолекулярная конверсия $S_3 \rightarrow S_1$ с характерным временем 83 ± 9 фс. При возбуждении комплекса в области полосы Q_y на длине волны 670 нм наблюдался релаксационный переход между двумя экситонными состояниями димера хлорофилла со временем 105 ± 10 фс. Получены спектры поглощения возбужденных синглетных состояний S_1 и S_3 хлорофилла *a*. Продemonстрировано, что делокализация возбужденного состояния между экситонно-сопряженными молекулами хлорофилла в тетрамере BoWSCP изменяется во времени и зависит от энергии возбуждения. При возбуждении BoWSCP в области полосы Core наблюдается сверхбыстрая фотохимическая реакция, обусловленная, по всей видимости, восстановлением триптофана в ближайшем окружении хлорофилла.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хлорофилл *a*, белки семейства WSCP, фемтосекундная лазерная спектроскопия, спектр возбужденного состояния, экситонная динамика, внутримолекулярная конверсия.

DOI: 10.31857/S0320972523100135, EDN: OTSLKL

ВВЕДЕНИЕ

Анализ фотохимических реакций переноса энергии и разделения зарядов в фотосинтетических пигмент-белковых комплексах затруднен их сложной молекулярной организацией и наличием большого количества экситонно-сопряженных молекул хлорофилла (Хл). Интерпретация абсорбционной динамики фото-

синтетических комплексов, регистрируемой методами фемтосекундной лазерной спектроскопии, представляет значительные методические трудности [1, 2]. Хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP (Water-Soluble Chlorophyll Binding Proteins) из высших растений представляют собой идеальную модельную систему для изучения механизма фотохимических реакций [3–6]. Эти белки водорастворимы,

Принятые сокращения: Хл – хлорофилл; BL – суммарное выцветание в области стимулированного излучения (GSB + SE); BoWSCP – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок семейства WSCP из *Brassica oleracea* var. botrytis; GSB – выцветание основного состояния; ESA – поглощение возбужденного состояния; SE – стимулированное излучение возбужденного состояния; TA – переходное поглощение.

* Адресат для корреспонденции.

фото- и термостабильны, могут быть эффективно модифицированы и продуцированы методами генной и белковой инженерии. В клетке растений эти белки локализованы вне тилакоидных мембран хлоропластов и не участвуют в фотосинтетическом процессе. Предполагается, что их физиологические функции связаны с активностью антистрессовых систем клетки [4, 7, 8]. По сравнению с фотосинтетическими пигмент-белковыми комплексами структура белков WSCP относительно проста. Холоформы WSCP представляют собой водорастворимые гомотетрамеры с молекулярной массой 69–80 кДа, при этом каждый комплекс содержит до четырех нековалентно связанных молекул Хл. В зависимости от степени гомологии первичной структуры апобелка семейство WSCP подразделяется на классы I и II, причем в последнем выделяют подклассы IIa и IIb по разной аффинности апобелков к Хл *a* и *b* [6, 9]. Было показано, что при фотовозбуждении Хл в WSCP происходит миграция энергии как внутри димера, так и между димерными парами [10, 11]. Это свойство делает WSCP класса II перспективной моделью для изучения механизмов пигмент-пигментных и пигмент-белковых взаимодействий, с помощью которой возможно исследовать механизмы переноса энергии возбуждения между пигментами [12–14] и взаимодействие возбужденных пигментов с белковым окружением [15–17].

В данной работе методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» изучались фотохимические процессы в симметричном тетрамерном комплексе белка BoWSCP подкласса IIa из *Brassica oleracea* var. botrytis, который связывает преимущественно Хл *a*, то есть их пигментный состав можно считать практически гомогенным [5]. Тетрамерный комплекс Хл в белке BoWSCP организован в виде двух димеров, причем угол между плоскостями порфириновых ядер пигментов в димере составляет около 30° [18]. В совокупности два димера в составе макромолекулы холобелка формируют нековалентную тетрамерную структуру, в которой димерные пары Хл соединены друг с другом фитольными «хвостами» [19]. Энергия экситонного взаимодействия мономеров в димере составляет примерно 100 см⁻¹, взаимодействие между димерами в десять раз слабее [13, 20]. Недавно было показано, что Хл в составе данной структуры обладает фотокаталитической активностью в редокс-процессах [21].

Настоящая работа посвящена количественному анализу процессов безызлучательной внутримолекулярной конверсии из третьего

в низшее возбужденное состояние, а также электронных переходов между экситонными уровнями полосы Q_y тетрамера Хл *a* при возбуждении BoWSCP в области полосы Core и полосы Q_y. Рассматриваются спектральные характеристики, позволяющие определять степень делокализации возбужденного состояния (экситона) между несколькими молекулами Хл в тетрамерном комплексе, а также детектировать реакции переноса электрона с участием возбужденных молекул Хл *a* в данном комплексе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты апобелка BoWSCP получали, экспрессируя гены этого белка, встроенные в плазмиды, которыми были трансформированы клетки штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3), согласно используемым ранее протоколам [5, 6, 22]. Благодаря наличию на N-концах апобелков шести гистидиновых остатков (6xHis) очистку их препаратов проводили с использованием аффинной хроматографии на колонке с Ni-агарозой с последующим диализом препарата. Чистоту препаратов проверяли методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле [5, 6]. Самосборку холоформ BoWSCP осуществляли *in vitro* путем совместной инкубации апобелков и изолированных тилакоидных мембран шпината [4–6, 8, 22]. Учитывая высокую термостабильность тетрамеров белков WSCP, полученные препараты холоформ прогревали (95 °C, 10 мин) с целью удаления посторонних белков, после чего проводили окончательную очистку BoWSCP на колонке с Ni-агарозой [1, 23]. Очищенный препарат диализовали против 10 mM Tris-HCl (pH 8,0). Качество препаратов тетрамеров BoWSCP проверяли методами нативного электрофореза в полиакриламидном геле, абсорбционной, флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма. Электрофорез белков в денатурирующих и нативных условиях проводили в камере Mini PROTEAN Tetra System («Bio-Rad», США). Содержание белка в образцах измеряли методом Брэдфорда [24]. Спектры поглощения образцов регистрировали на спектрофотометрах Cary-50 («Agilent», США) и Shimadzu-1601PC («Shimadzu», Япония). Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрометре кругового дихроизма Chirascan («Applied Photophysics», США). Пересчет амплитуды сигналов ($\Delta\epsilon$) в единицы эллиптичности (θ) для спектров кругового ди-

хроизма проводили, согласно используемому ранее протоколу [23].

Препараты для фемтосекундной спектроскопии концентрировали путем центрифугирования в центрифужных концентраторах Amicon Ultra-15 («Merck», Германия) с фильтрами на 30 или 50 кДа. Концентрирование проводили серией центрифугирования препаратов белка BoWSCP в 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) с добавлением к ним NaCl до 150 mM или 10% (v/v) глицерина для предотвращения агрегации белка в высококонцентрированном растворе. Полученный концентрат разбавляли буфером такого же состава с NaCl или глицерином до получения 1 мл раствора с ОП₆₇₃ = 5.

Сверхбыстрые абсорбционные изменения $\Delta A(\lambda_i, t_m)$ регистрировались методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» в оптическом диапазоне $400 \leq \lambda \leq 780$ нм на временных задержках t от 20 фс до 200 пс. Экспериментальная установка и методика измерений были описаны ранее [25]. Возбуждение BoWSCP осуществлялось фемтосекундными лазерными импульсами с максимумами на длинах волн 430 нм (длительность — 40 фс, энергия — 20 нДж) и 670 нм (длительность — 16 фс, энергия — 15 нДж). Зондирование обеспечивалось широкополосными импульсами суперконтинуума при углах поляризации 0; 54,7 и 90 градусов относительно поляризации возбуждающего импульса. Разностные спектры поглощения в диапазоне 400–780 нм снимали с помощью ПЗС-камеры SPEC-10 («Roper Scientific», США), соединенной с полихроматором SP-300 («Acton», США). Эксперименты проводились при температуре 6 °C в проточной оптической ячейке (толщина — 0,5 мм; диаметр оптических окон — 0,2 мм; оптическая плотность образца — 10 см⁻¹). Скорость циркуляции в проточной ячейке (9 мл/мин) была достаточно высокой, чтобы избежать многократного возбуждения одного и того же объема пробы. Спектры корректировались дисперсией групповой задержки, как описано ранее [26, 27]. Учет когерентного артефакта и деконволюции аппаратной функции в области $t = 0$ проводился по методике, предложенной в работах Dobryakov et al. [26, 28]. Для этого абсорбционные изменения, вызванные нелинейными взаимодействиями в области перекрытия возбуждающего и зондирующего импульсов (когерентный спайк), аппроксимировались базовой гауссовой функцией:

$$G(t) = 1/\sqrt{2\pi d^2} \exp[-1/2(t/d)^2] \quad (1)$$

и ее производными по времени G' и G'' , где ширина возбуждающего импульса d находилась моделированием абсорбционных изменений чистого растворителя [29]. Сигнал, обусловленный изменением электронных состояний пигментов, аппроксимировался сверткой базовой гауссовой функции $G(t)$ и ступенчатой функции Хевисайда $H(t)$:

$$\chi(t) = G(t) * H(t) = 1/2 \operatorname{Erfc}[-t/\sqrt{2\pi d^2}], \quad (2)$$

а также свертками $G(t)$ и экспоненциальных функций:

$$\begin{aligned} \varepsilon(t, \tau_k) &= G(t) * \exp(-t/\tau_k) = \\ &= 1/2 \exp[1/2(d/\tau_k)^2 - t/\tau_k] \operatorname{Erfc}[(d/\tau_k - t/d)/\sqrt{2}], \end{aligned} \quad (3)$$

амплитуды $A_k(\lambda_i)$ которых находились линейной регрессией, а характерные времена τ_k определялись методом нелинейной минимизации.

Математический анализ абсорбционной динамики включал разложение спектрально-временных матриц $\Delta A(\lambda_i, t_m)$ на линейную комбинацию n дискретных экспоненциальных функций:

$$Q[\tau](\lambda, t) = \sum_{k=1}^n D_k(\lambda) \cdot \exp(-t/\tau_k) + D_{n+1}(\lambda) \quad (4)$$

в предположении, что характерные времена $\tau = \{\tau_k\}$ не зависят от длины волны наблюдения λ и, следовательно, могут рассматриваться как «глобальные» параметры, определяемые нелинейной минимизацией нормированной суммы квадратов невязок:

$$\begin{aligned} R[\tau] &= (L \cdot M - n)^{-1} \sum_{l=1}^L \sum_{m=1}^M [\Delta A(\lambda_l, t_m) - \\ &- Q[\tau](\lambda_l, t_m)]^2. \end{aligned} \quad (5)$$

Зависящие от длины волны предэкспоненциальные амплитуды $D_k(\lambda)$, рассчитываемые стандартным методом линейной регрессии для каждой экспоненциальной функции k , определяют спектры, связанные с распадом (Decay-Associated Spectra, DAS), одновременно рассчитывается финальный спектр $D_{n+1}(\lambda)$. После того как найдены оптимальные значения $\{\tau_k\}$ характерных времен, стандартную ошибку их определения можно оценить с помощью матрицы Якоби J :

$$J_{jk} = \frac{\delta Q_j[\tau]}{\delta \tau_k}, \quad (6)$$

где индекс j пробегает $L \times M$ экспериментальных точек спектрально-временной матрицы $\Delta A(\lambda_i, t_m)$ [30]. Численную оценку якобиана

можно получить, разложив выражение $Q_j[\tau]$ в ряд Тейлора до первого порядка:

$$\frac{\delta Q_j[\tau]}{\delta \tau_k} \approx \frac{Q_j[\tau + \Delta \tau e_k] - Q_j[\tau - \Delta \tau e_k]}{2\Delta \tau_k}, \quad (7)$$

где τ — набор оптимальных значений $\{\tau_k\}$ характерных времен, e_k — k -й единичный вектор, а $\Delta \tau$ — небольшое приращение τ (для числовой оценки использовалось значение $0,015\tau$). Стандартные ошибки σ_k определения характерных времен можно получить из диагональных элементов ковариационной матрицы $C = R[\tau] \times (J^T J)^{-1}$:

$$\sigma_k = \sqrt{C_{kk}}. \quad (8)$$

Значения σ_k представляют собой стандартные отклонения, характеризующие неопределенность оценок $\{\tau_k\}$. Согласно t -распределению Стьюдента, 95%-ная достоверность получается при удвоении стандартных отклонений; соответственно, доверительные интервалы равны $\tau_k \pm 2\sigma_k$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Следуя методу, предложенному в работе Hughes et al. [20], пигментный состав полученных препаратов холоформ BoWSCP был определен с помощью разложения его спектра поглощения в области полосы Core (360–500 нм) на относительные вклады Хл a и Хл b с использованием спектров поглощения индивидуальных пигментов в 90%-ном ацетоне [31]. На рис. 1, a проведено сопоставление спектра поглощения BoWSCP со спектрами Хл a и b . В спектре поглощения свободного Хл a полосы поглощения Core и Q_y с максимумами около 430 и 663 нм имеют близкую амплитуду; в спектре Хл b эти полосы сближены и располагаются соответственно при 458 и 645 нм, при этом амплитуда полосы Core увеличена, а полосы Q_y — уменьшена относительно полос Хл a . Присутствие Хл b в спектре BoWSCP выявляется по небольшому плечу в области 470 нм, тогда как поглощение в интервале 380–430 нм обусловлено преимущественно Хл a . Сравнение спектров BoWSCP и свободного Хл a демонстрирует существенный эффект белкового окружения в области 360–450 нм: во-первых, полосы Хл a сдвинуты в красную область на ~8 нм, во-вторых, интенсивности двух основных переходов Хл a в области полосы Core (полоса B_x с максимумом на длине волны 430 нм соответствует переходу $S_0 \rightarrow S_3$, полоса B_y с максимумом на длине вол-

ны 380 нм соответствует переходу $S_0 \rightarrow S_4$ [32]) заметно изменены в пользу полосы с максимумом на ~380 нм. Электронная структура спектра поглощения Хл a в области полосы Core плохо описывается в рамках четырехорбитальной модели, предложенной Gouterman [33], поскольку между возбужденными состояниями B_x и B_y присутствуют состояния не соответствующие четырехорбитальной модели, смешанные с вибранными переходами полосы B_x , в результате энергии и дипольные силы этих состояний зависят от диэлектрического окружения пигмента [32, 34, 35].

Как видно из рис. 1, a , в белковом окружении BoWSCP относительная вероятность перехода $S_0 \rightarrow S_3$ уменьшена, а вероятность перехода $S_0 \rightarrow S_4$ увеличена по сравнению со свойствами свободного Хл a в растворе. По этой причине моделирование спектра поглощения BoWSCP проводилось с помощью эмпирического выражения, представляющего собой сумму модифицированных спектров поглощения Хл a и Хл b и учитывающего перераспределение интенсивности полос Хл a в области 360–500 нм:

$$A(\lambda) = \alpha \cdot A_{Chla}(\lambda - \delta_a) \times \\ \times [1 - \gamma \cdot \tanh((\lambda - \lambda_a) / \Delta)] + \beta \cdot A_{Chlb}(\lambda - \delta_b), \quad (9)$$

где α и β — относительные количества Хл a и Хл b в тетрамере BoWSCP; A_{Chla} и A_{Chlb} — спектры Хл a и Хл b в 90%-ном ацетоне; δ_a и δ_b — сдвиги спектров Хл a и Хл b в BoWSCP относительно их спектров в растворе; эмпирическая функция $\gamma \tanh((\lambda - \lambda_a) / \Delta)$ описывает изменение соотношения интенсивности полос B_x и B_y Хл a в спектральном интервале шириной Δ с центром на длине волны λ_a . Значения указанных параметров, определенные с помощью нелинейной минимизации, составили $\alpha = 89,2\%$; $\beta = 10,8\%$; $\delta_a = 9,2$ нм; $\delta_b = 1,4$ нм; $\gamma = 0,67$; $\lambda_a = 413$ нм; $\Delta = 50$ нм; модельный спектр показан на рис. 1, b тонкой сплошной линией. Относительные вклады Хл a и Хл b получились равными 89% и 11% соответственно. Соотношение пигментов Хл a/b в пропорции 8 : 1 соответствует диапазону значений (6–10) : 1, полученных в разных работах для нативного белка BoWSCP [3].

Поглощение BoWSCP в области полосы Q_y (660–700 нм) обусловлено преимущественно поглощением Хл a , вклад Хл b в этом спектральном интервале незначителен (рис. 1, b). Спектральные свойства BoWSCP определяются молекулярной структурой пигмент-белкового комплекса: четыре идентичных субъединицы образуют тетрамер, в котором три

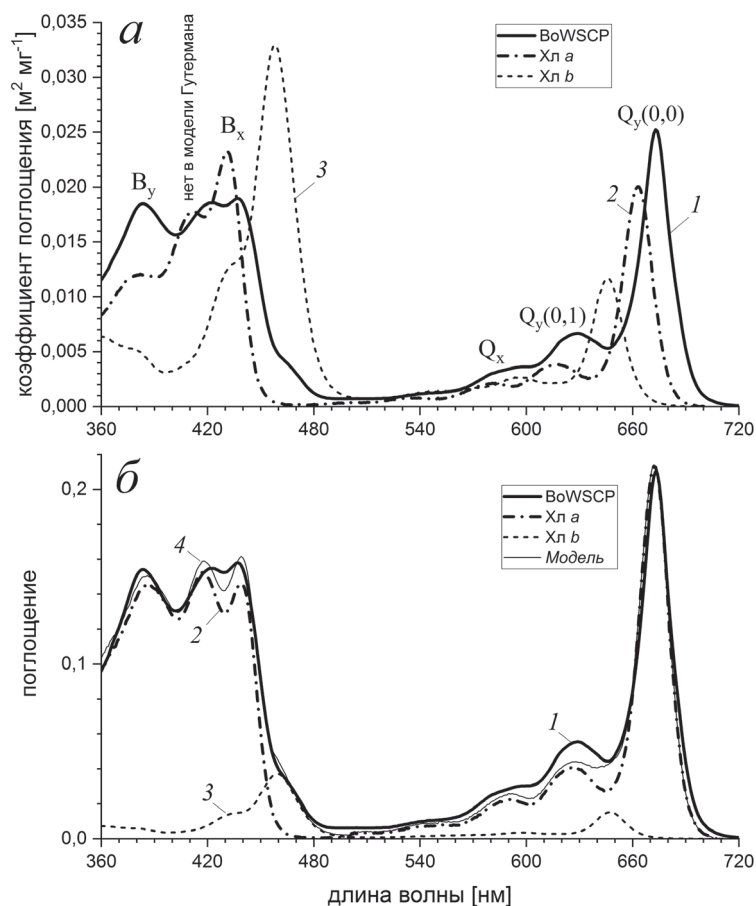


Рис. 1. Определение вкладов Хл *a* и Хл *b* в спектр поглощения BoWSCP. *a* – Сравнение спектра поглощения холоформы BoWSCP в буферном растворе (1) со спектрами Хл *a* (2) и Хл *b* (3) в 90%-ном ацетоне (взяты из открытой базы спектральных данных [31]). *б* – Моделирование спектра BoWSCP (1) с помощью модифицированного, в соответствии с уравнением (9), спектра Хл *a* (2) и Хл *b* (3). В области 500–720 нм амплитуда спектра Хл *a* увеличена на 15%. Относительные вклады Хл *a* и Хл *b* в модельный спектр (4) составляют 89% и 11% соответственно

взаимно ортогональных оси симметрии вращения $C_2(X)$ $C_2(Y)$ $C_2(Z)$ задают систему координат XYZ [18]. Четыре молекулы хлорофилла, находящиеся в гидрофобном локусе, объединены в двойной димер: взаимодействие между димерами существенно слабее взаимодействия мономеров внутри димера (рис. 2).

Преобладающим эффектом в области 660–700 нм является экситонное взаимодействие молекул Хл *a* внутри димера, тогда как взаимодействие димеров друг с другом выражено значительно слабее. Форма спектра поглощения BoWSCP в области полосы Q_y (рис. 3, *a*) свидетельствует о наличии двух экситонных полос, максимумы которых при 672 и 684 нм соответствуют минимумам второй производной (рис. 3, *б*) и максимумам четвертой производной (рис. 3, *в*). Следуя методу, предложенному для анализа спектров WSCP [20], параметры экситонного взаимодействия Хл *a* были найдены разложением спектра поглощения BoWSCP в области полосы $Q_y(0,0)$ на гауссовы компоненты. Для корректной

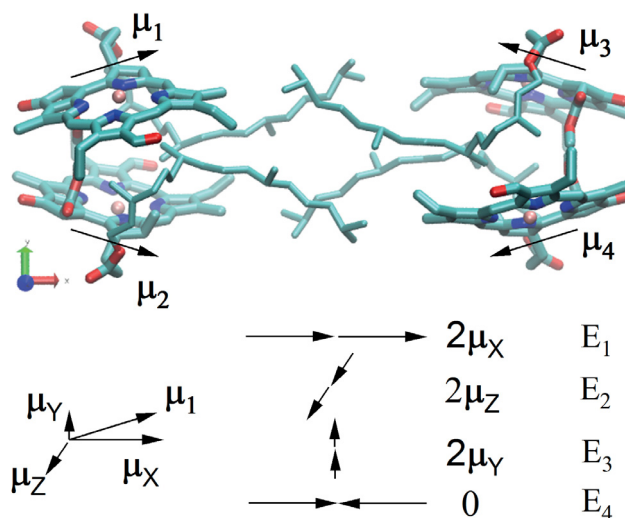


Рис. 2. Расположение молекул хлорофилла в тетрамерном комплексе BoWSCP по данным рентгеновской кристаллографической структуры PDB ID: 6s2z [18], в которой Хл *b* заменен на Хл *a*. Проиллюстрировано направление векторов μ_k (k 1–4) дипольных моментов $S_0 \rightarrow S_1$ перехода мономеров Хл, а также дипольных моментов четырех экситонных состояний E_n тетрамерного комплекса

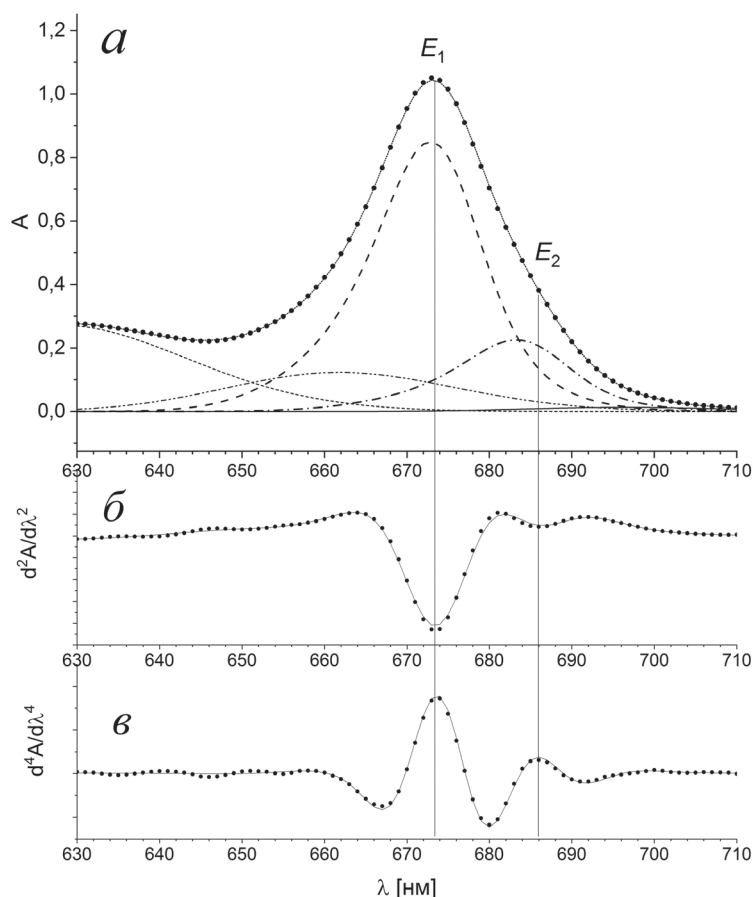


Рис. 3. Спектр поглощения (*a*), его вторая (*б*) и четвертая (*в*) производные холоформы BoWSCP (точки). Сплошными линиями представлен модельный спектр, его основные гауссовские компоненты показаны пунктирными линиями. Вертикальным пунктиром отмечены положения максимумов четвертой производной спектра поглощения

аппроксимации полосы $Q_y(0,0)$ с учетом внутримолекулярных колебательных мод тетрапирольного макроцикла Хл использовались дополнительные гауссовы компоненты в высокоэнергетической области полосы $Q_y(0,0)$ [20, 36, 37]. Относительная интенсивность основной полосы E_1 с максимумом на длине волны 672 нм составила 79%, вклад второй полосы E_2 с максимумом на длине волны 684 нм — ~21%, спектральные характеристики состояния E_3 определить не удалось, состояние E_4 в приближении точечных диполей имеет нулевую интенсивность.

Методом широкополосной фемтосекундной спектроскопии «возбуждение-зондирование» была измерена абсорбционная динамика холоформы BoWSCP, индуцированная возбуждением в области длин волн 430 и 670 нм. Возбуждение в этих спектральных областях связано преимущественно с Хл *a* (квантовый выход >98%) и лишь в малой степени — с Хл *b* (<2%). На рис. 4 приведены абсорбционные изменения в фемтосекундном временном диапазоне на длинах волн 450 нм (*a*) и

670 нм (*б*), индуцированные импульсом 670 нм длительностью 16 фс (толстые сплошные линии). Когерентный артефакт был аппроксимирован суперпозицией гауссовой функции $G(t)$ (уравнение (1)) и ее производных G' и G'' с параметром d , равным 24 фс (пунктирные линии), а абсорбционные изменения BoWSCP — комбинацией функций $\chi(t)$ и $\varepsilon(t, \tau_k)$, задаваемых уравнениями (2) и (3) (штрихпунктирные линии). Абсорбционные изменения BoWSCP, начиная с нулевой временной задержки ($t = 0$), были получены вычитанием когерентного артефакта и деконволюции результирующего сигнала (тонкие сплошные линии).

На рис. 5, *a* приведены переходные спектры при временной задержке 50 фс, индуцированные импульсами 430 нм (1, сплошная линия) и 670 нм (2, штрихпунктирная линия). Возбуждение на длине волны 430 нм связано с переходом Хл преимущественно в третье синглетное возбужденное состояние $S_0 \rightarrow S_3$ (полоса B_x), тогда как при возбуждении на длине волны 670 нм происходило образование состояния S_1 (полоса Q_y). Данную интерпретацию

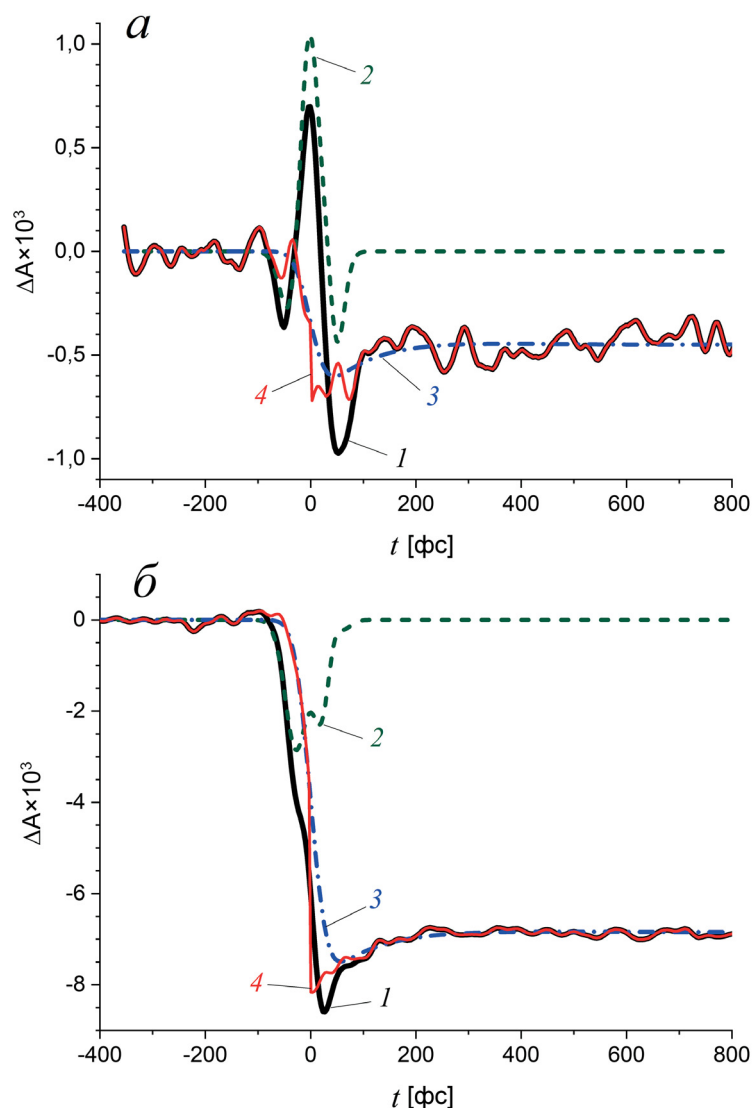


Рис. 4. Абсорбционные изменения VoWSCP на длине волны 450 нм (а) и 670 нм (б), индуцированные импульсом 670 нм длительностью 16 фс (линия 1). Когерентный артефакт был аппроксимирован суперпозицией гауссовой функции $G(t)$ и ее производных G' и G'' , рассчитанных для значения параметра $d = 24$ фс (линия 2), а абсорбционные изменения VoWSCP – комбинацией функций $\chi(t)$ и $\varepsilon(t, \tau_k)$ (линия 3). Абсорбционный отклик VoWSCP с нулевой временной задержкой ($t = 0$) был получен вычитанием когерентного артефакта и деконволюцией результирующего сигнала (линия 4)

подтверждает отрицательный коэффициент анизотропии в области полосы Q_y при возбуждении на длине волны 430 нм, величина которого близка к теоретическому пределу $-0,1$ (вставка на рис. 5, а).

Амплитуда выцветания полосы Q_y в переходных спектрах VoWSCP на рис. 5 в 3–5 раз больше амплитуды выцветания полосы S_{0re} , тогда как в спектре поглощения VoWSCP на рис. 1, а полоса Q_y сравнима по амплитуде с полосой S_{0re} . Переходный спектр, наблюдаемый в фемтосекундных измерениях, представляет собой сумму спектров трех составляющих. Во-первых, это спектр выцветания, появляющийся в результате исчезновения ос-

новного состояния S_0 , его форма соответствует линейному спектру поглощения с отрицательным знаком. Во-вторых, это спектр поглощения возникающего возбужденного состояния S^* , его вклад всегда положительный. В-третьих, это спектр стимулированного излучением обратного перехода $S^* \rightarrow S_0$, для нижнего возбужденного состояния его форма близка спектру спонтанной флуоресценции, а вклад – отрицательный. Основное различие между спектрами (1) и (2) на рис. 5, а наблюдается в области полосы Q_y , где имеет место стимулированное излучение перехода $S_1 \rightarrow S_0$, которое отсутствует на временах жизни состояния S_3 при возбуждении на длине волны 430 нм.

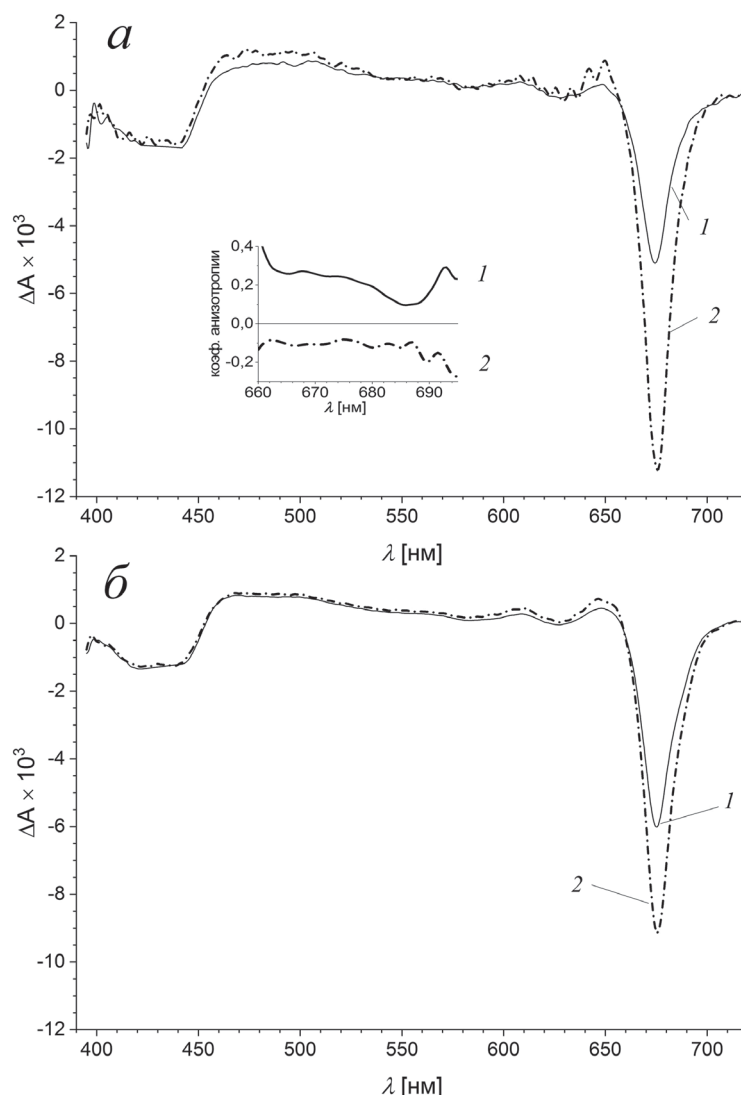


Рис. 5. Переходные спектры BoWSCP на задержках 50 фс (*а*) и 200 пс (*б*), инициированные возбуждением на длинах волн 430 нм (1) и 670 нм (2). Спектры масштабированы по области полосы Core 400–500 нм при задержке 200 пс; угол поляризации – 54,7°. На вставке показан коэффициент анизотропии в области полосы Q_y

Менее значительное различие между спектрами (1) и (2) в области 420–500 нм может быть объяснено стимулированным излучением перехода $S_3 \rightarrow S_0$.

На рис. 5, *б* приведены переходные спектры при временной задержке 200 пс в тех же обозначениях: (1) – возбуждение 430 нм, (2) – 670 нм. В этом временном диапазоне должны завершиться процессы внутримолекулярной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$ и установления теплового равновесия в распределении четырех экситонных состояний E_n тетрамерного комплекса. Наблюдаемые финальные спектры близки во всем диапазоне за исключением полосы Q_y , где амплитуда выцветания после возбуждения на длине волны 670 нм значительно превосходит выцветание, индуцированное возбуждением на длине волны 430 нм.

Наиболее значимые абсорбционные изменения BoWSCP связаны с увеличением амплитуды выцветания полосы Q_y после возбуждения на длине волны 430 нм. Его количественные характеристики были определены с помощью разложения абсорбционной динамики на экспоненциальные компоненты, связанные с распадом (DAS, см. раздел «Материалы и методы»); разложение выявило спектральные переходы в диапазоне 100 фс и 10 пс (рис. 6).

На рис. 6, *а* представлены дифференциальные спектры распада для фемтосекундного диапазона. После возбуждения на длине волны 430 нм основные спектральные изменения происходят с характерным временем 83 ± 9 фс, они могут быть приписаны внутримолекулярной безызлучательной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$, в результате которой исчезает стимулированное

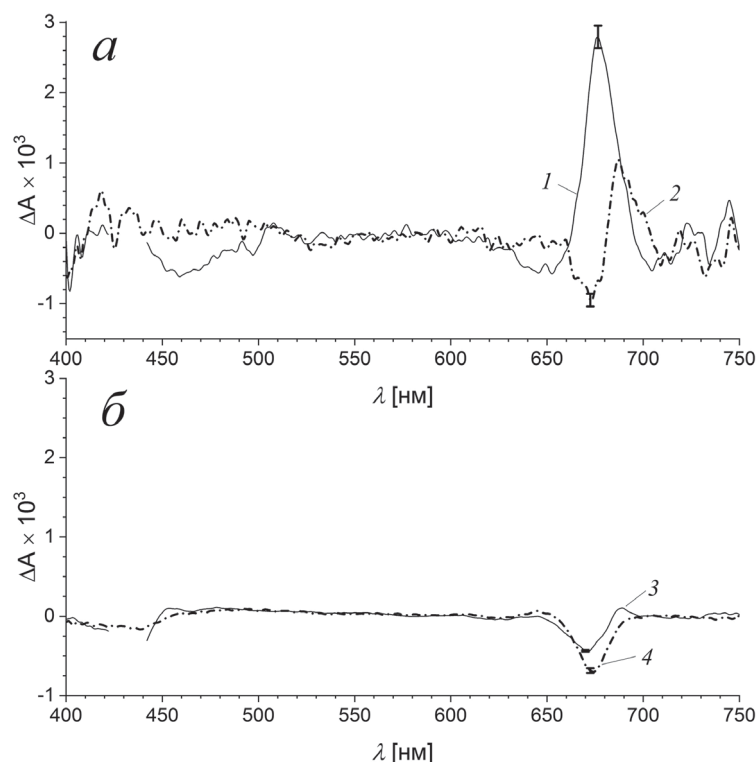


Рис. 6. Ассоциированные с экспоненциальным распадом спектры BoWSCP в диапазоне 100 фс (а) и 10 пс (б) после возбуждения на длинах волн 430 нм (1, 3) и 670 нм (2, 4). Характерные времена: 1 – 83 фс; 2 – 105 фс; 3 – 19 пс; 4 – 14 пс. Отметки на графиках в области полосы Q_y показывают доверительные интервалы, рассчитанные с помощью уравнения (8)

излучение в области полосы Core (450–480 нм) и появляется стимулированное излучение в области полосы Q_y (670–690 нм). При возбуждении BoWSCP в области полосы Q_y на длине волны 670 нм небольшие спектральные изменения в субпикосекундном диапазоне происходят со временем 105 ± 10 фс, они могут быть отнесены к релаксационному переходу между двумя экситонными уровнями E_1 и E_2 полосы Q_y димера Хл *a*.

В пикосекундном диапазоне значимые изменения поглощения происходят с характерным временем ~ 16 пс. Дифференциальные спектры распада, рассчитанные для возбуждения на длинах волн 430 нм (характерное время 19 ± 3 пс) и 670 нм (характерное время 14 ± 2 пс), близки во всем спектральном диапазоне (рис. 6, б) и связаны с незначительным по амплитуде восстановлением поглощения в области полосы Q_y с максимумом около 675 нм. Возможная интерпретация этих изменений будет рассмотрена далее.

Для количественной характеристики фотохимических процессов, наблюдаемых с помощью фемтосекундных измерений в экситонно-сопряженной системе пигментов, было проведено разложение переходных спектров (Transient Absorption, TA) на три составляющих:

выцветание основного состояния (Ground State Bleach, GSB), поглощение возбужденного состояния (Excited State Absorption, ESA) и стимулированное излучение (Stimulated Emission, SE). Вероятность поглощения отдельной молекулой пигмента кванта света энергии $\hbar\omega_0$ пропорциональна квадрату дипольного момента $|\mu|^2$ ее перехода между основным и возбужденным состояниями (дипольной силе перехода). Для мономера Хл *a* в белке дипольный момент перехода $S_0 \rightarrow S_1$ равен 5,5 Д [38]. Импульс накачки переводит в образце ΔN молекул из основного состояния в возбужденное. Пробный импульс разделяется на два пучка: один проходит через невозбужденный образец, другой – через область возбуждения, разница в интенсивности прошедших пучков определяет дифференциальное поглощение. В области возбуждения количество молекул в основном состоянии уменьшено на ΔN , поэтому поглощение на частоте ω_0 в этой области уменьшено на величину, пропорциональную дипольной силе перехода: $\Delta A_{GSB} \propto |\mu|^2$. Одновременно с этим имеет место стимулированное световой волной излучение света при обратном переходе $S_1 \rightarrow S_0$, вероятность которого также пропорциональна квадрату дипольного момента, поэтому поглощение на частоте ω_0 дополнительно

уменьшается на ту же величину $\Delta A_{SE} \propto |\mu|^2$. Для идеальной двухуровневой системы отношение $\beta = \Delta A_{SE}/\Delta A_{GSB}$ равно единице [39]; для Хл *a* в различных растворителях была получена оценка $\beta \approx 0,9$ [40, 41].

Для экситонно-сопряженных пигментов ситуация более сложная. Дипольный момент перехода экситонного комплекса можно представить линейной комбинацией дипольных моментов его мономеров [42]. В кристаллографической структуре BoWSCP [18] дипольные моменты мономеров μ_k ориентированы практически параллельно кристаллографической оси X, а проекции моментов на оси Y и Z много меньше по абсолютной величине [13], и в первом приближении их можно положить равными нулю. Проекция дипольного момента мономера на кристаллографические оси схематически изображены на рис. 2.

При описании взаимодействия световой волны с молекулами Хл в BoWSCP возникает фундаментальный вопрос: является ли возникающее возбужденное состояние локализованным в пределах димера (энергия сопряжения $\sim 100 \text{ см}^{-1}$) или оно делокализовано по всему тетрамерному комплексу (энергия сопряжения $\sim 10 \text{ см}^{-1}$). Данные фемтосекундных измерений позволяют определить степень делокализации возбужденного состояния, то есть количество молекул Хл, эффективно участвующих в экситонном сопряжении.

Для симметричного димера дипольные моменты перехода в два возможных возбужденных состояния E_+ и E_- равны [43]:

$$\mathbf{M}_{\pm} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\mu_1 \pm \mu_2). \quad (10)$$

Следует отметить, что экситонное взаимодействие мономеров не меняет суммарную дипольную силу комплекса: $|\mathbf{M}_+|^2 + |\mathbf{M}_-|^2 = \mu_1^2 + \mu_2^2$, поэтому интегральная амплитуда линейного спектра поглощения остается постоянной. В силу геометрии BoWSCP дипольная сила перехода в состояние E_+ равна $|\mathbf{M}_+|^2 \cong \mu_1^2 + \mu_2^2 = 2\mu_1^2$, тогда как дипольная сила перехода в состояние E_- близка к нулю, поэтому при возбуждении BoWSCP широкополосным импульсом с центром на длине волны 670 нм (полуширина — 50 нм, время $\tau = 16 \text{ фс}$) в первоначальном распределении возникающих экситонных состояний существенно преобладает состояние E_+ . В этом случае суммарная амплитуда выцветания ΔA_{BL} начального переходного спектра вблизи полосы экситонного расщепления на частоте ω_0 :

$$\Delta A_{BL} = \Delta A_{GSB} + \Delta A_{SE} \propto (1 + \beta) 2\mu_1^2 \approx 4\mu_1^2. \quad (11)$$

В остальной части спектрального диапазона выцветание основного состояния пропорционально дипольной силе свободного мономера:

$$\Delta A_{GSB}(\omega) \propto \mu_1^2. \quad (12)$$

Для симметричного тетрамера дипольные моменты перехода в четыре возможных экситонных состояния находятся унитарным преобразованием [42], момент с наибольшей амплитудой равен:

$$\mathbf{M}_1 = \frac{1}{2}(\mu_1 + \mu_2 - \mu_3 - \mu_4). \quad (13)$$

В этом случае суммарная амплитуда выцветания переходного спектра вблизи полосы экситонного расщепления:

$$\Delta A_{BL} \propto 8\mu_1^2. \quad (14)$$

В целом количество экситонно-сопряженных молекул n_{excited} , между которыми делокализовано возбужденное состояние, возможно определить по отношению суммарной амплитуды выцветания переходного спектра на частоте экситонного перехода ω_0 и амплитуды линейного спектра, который не учитывает селективный характер возбуждения экситонного комплекса:

$$n_{\text{excited}} = \frac{1}{2} \Delta A_{BL} / \Delta A_{GSB}. \quad (15)$$

При возбуждении BoWSCP в области 670 нм амплитуду выцветания основного состояния ΔA_{GSB} можно определить по полосе Core. На рис. 7 точками показаны переходные спектры BoWSCP при временной задержке 50 фс после возбуждения на длинах волн 430 нм (а) и 670 нм (б).

В области 400–500 нм переходные спектры (1) близки по форме к спектру поглощения BoWSCP (2) за исключением области 450–480 нм, где преобладает поглощение Хл *b* и стимулированное излучение Хл *a* из состояния S_3 . Предполагая, что спектры поглощения возбужденных состояний S_1 и S_3 являются гладкими функциями в указанном интервале длин волн и могут быть корректно описаны полиномами $P_3(\lambda)$ третьей степени, переходные спектры были аппроксимированы выражением:

$$\Delta A_{TA}(\lambda) = \xi \cdot \Delta A_{GSB}(\lambda) + P_3(\lambda), \quad (16)$$

в котором масштабирующий множитель ξ и коэффициенты кубического полинома P_3 находились стандартным решением задачи линейной регрессии. Спектры поглощения

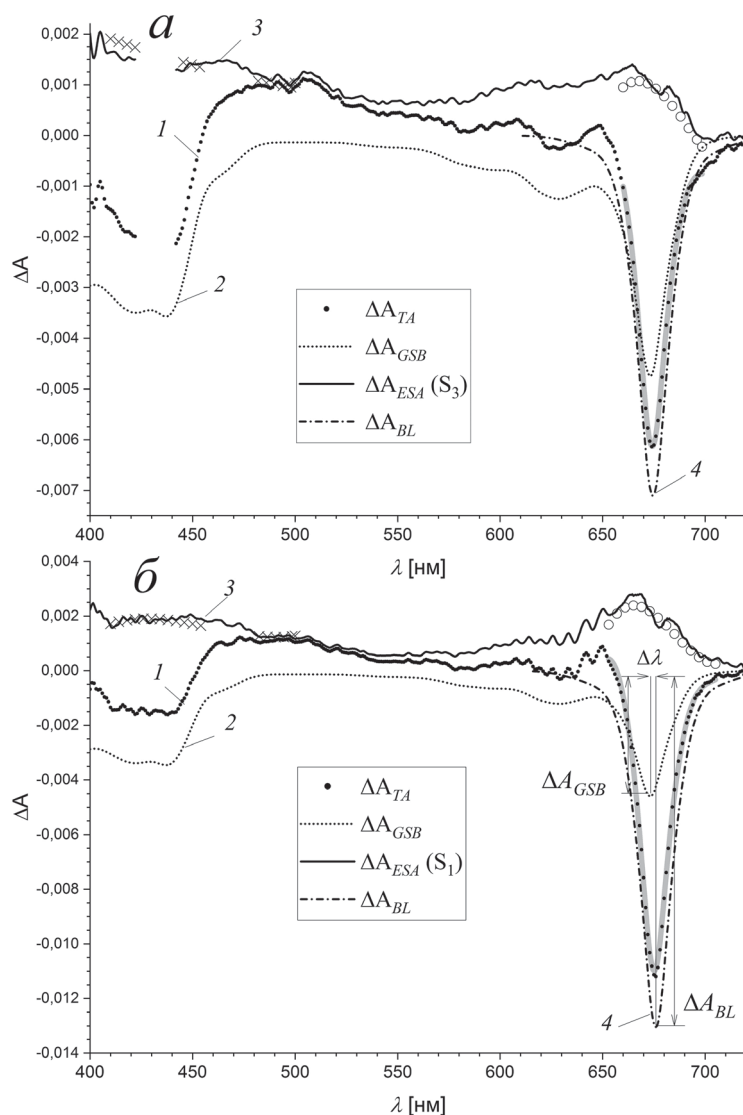


Рис. 7. Разложение переходных спектров поглощения BoWSCP (1 – Transient Absorption, TA) на компоненты выцветания основного состояния (2 – Ground State Bleaching, GSB), поглощения возбужденного состояния (3 – Excited State Absorption, ESA) и выцветания в области стимулированного излучения (4 – Bleach, BL). Переходные спектры получены при задержке 50 фс после возбуждения на длинах волн 430 нм (а) и 670 нм (б). Нормировка спектра выцветания (2) проводилась по переходному спектру (1) в области 400–500 нм с учетом аппроксимации спектра возбужденного состояния кубической полиномиальной функцией (×). Модельный спектр выцветания в области стимулированного излучения (4) в диапазоне 650–700 нм был представлен суммой $\Delta A_{BL} = n_{\text{excited}} \cdot (\Delta A_{GSB} + \Delta A_{SE})$ линейного спектра поглощения и его зеркального отражения относительно максимума полосы поглощения Q_y и сдвига Стокса $\Delta\lambda$. Относительная амплитуда модельного спектра n_{excited} находилась линейной регрессией с помощью полиномиальной аппроксимации спектра возбужденного состояния (○). Утолщенная серая линия представляет результат данного разложения

возбужденных состояний в области, где отсутствует стимулированное излучение, находятся как разность $\Delta A_{ESA}(\lambda) = \Delta A_{TA}(\lambda) - \xi \cdot \Delta A_{GSB}(\lambda)$. На рис. 7 показаны полученные таким образом спектры выцветания основного состояния (2), полиномиальные функции P_3 (×) и спектры поглощения возбужденных состояний (3).

Модельный спектр выцветания (4) вблизи полосы Q_y был представлен суммой линейного спектра поглощения, взятого с обратным знаком $\Delta A_{GSB}(\lambda)$, и его зеркального отражения относительно максимума полосы Q_y $\Delta A_{SE}(\lambda)$.

Поскольку положение 0-0-перехода оставалось неизвестным, величину сдвига Стокса $\Delta\lambda$ спектра стимулированного излучения находили нелинейной минимизацией суммарного модельного спектра:

$$\Delta A_{TA}(\lambda) = n_{\text{excited}} \cdot \xi \cdot [\Delta A_{GSB}(\lambda) + \Delta A_{GSB}(\lambda_0 + \Delta\lambda - \lambda)] + P_3(\lambda). \quad (17)$$

Эффективное число экситонно-сопряженных молекул n_{excited} и коэффициенты полиномиальной функции P_3 находились линейной

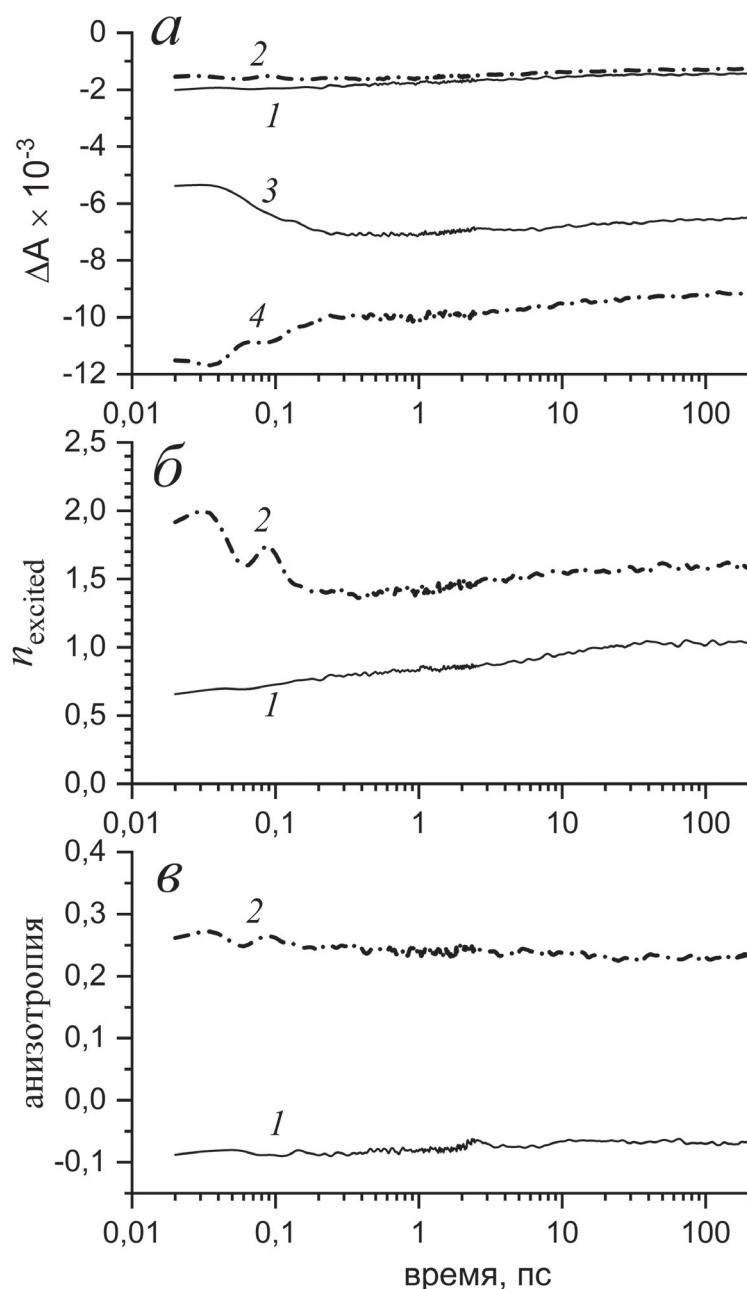


Рис. 8. Изменение во времени основных параметров, характеризующих возбужденное состояние тетрамерного комплекса BoWSCP. *a* – Амплитуда выцветания полосы Soret (1, 2) и полосы Q_y (3, 4) после возбуждения на 430 нм (1, 3) и 670 нм (2, 4). *б* – Эффективное число экситонно-сопряженных молекул Хл, рассчитанное по уравнению (15) при возбуждении на 430 нм (1) и 670 нм (2). *в* – Коэффициент анизотропии, рассчитанный в области полосы Q_y при возбуждении на 430 нм (1) и 670 нм (2)

регрессией. Серая утолщенная линия на рис. 7 представляет результат данного разложения. При возбуждении на длине волны 430 нм наблюдаемая амплитуда выцветания ΔA_{BL} полосы Q_y лишь незначительно превышает амплитуду выцветания основного состояния ΔA_{GSB} , тогда как при возбуждении на длине волны 670 нм амплитуда ΔA_{BL} втрое превышает амплитуду ΔA_{GSB} .

На рис. 8, *a* показана временная зависимость амплитуды выцветания полосы Soret (1, 2)

и полосы Q_y (3, 4), инициированная возбуждением BoWSCP на длинах волн 430 нм (сплошные кривые) и 670 нм (штрихпунктирные кривые). Изменение поглощения во временном диапазоне 100 фс при возбуждении на длине волны 430 нм (3) отражает появление стимулированного излучения в результате электронного перехода $S_3 \rightarrow S_1$, его характерное время составляет 80 фс. Как было отмечено выше, амплитуда выцветания полосы Q_y после возбуждения в области 430 нм остается во всем

временном интервале существенно меньше амплитуды выцветания этой полосы после возбуждения в области 670 нм. Другой особенностью является высокая амплитуда выцветания полосы Q_y после возбуждения на длине волны 670 нм во всем временном интервале: его амплитуда втрое превышает амплитуду выцветания полосы S_{0e} .

На рис. 8, б показано изменение во времени эффективного числа экситонно-сопряженных молекул X_l , между которыми делокализовано возбужденное состояние тетрамера, рассчитанного по уравнению (15), для двух вариантов возбуждения BoWSCP. На коротких задержках при возбуждении на длине волны 670 нм коэффициент $n_{excited}$ приближается к 2, то есть комплекс BoWSCP ведет себя как экситонно-сопряженный димер. При возбуждении на длине волны 430 нм на коротких задержках коэффициент $n_{excited}$ приближается к 0,5. Как было отмечено ранее, это свидетельствует о преобладании возбужденного состояния S_3 в данных условиях.

Наконец, на рис. 8, в приведено изменение коэффициента анизотропии, $r = (\Delta A_{||} - \Delta A_{\perp}) / (\Delta A_{||} + 2\Delta A_{\perp})$, рассчитанного в области полосы Q_y для двух вариантов возбуждения. Изменение амплитуды выцветания полосы Q_y на временах ~ 100 фс практически не связано с изменением анизотропии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белки класса WSCP представляют собой уникальную по организации модельную систему экситонно-сопряженных молекул хлорофилла [11], с помощью которой возможно исследовать механизмы переноса энергии возбуждения между пигментами [12–14] и взаимодействие возбужденных пигментов с белковым окружением [15–17]. Обмен энергией между электронной подсистемой и колебательными движениями ядер приводит к эволюции электронных состояний [44, 45]. Эффективность энергетического обмена экситона с фононными модами зависит от спектральной плотности колебательных состояний ядер, для экспериментального определения которой используют методы выжигания спектрального провала [46–48] и нестационарной флуоресцентной спектроскопии [10]. Вибронные полосы $X_l a$ включают более 40 мод в диапазоне от 1500 до 260 см^{-1} [49–51]. Величина электронного взаимодействия ближайших молекул $X_l a$ в тетрамере BoWSCP, полученная совместным разложением спектров поглощения и кругового

дихроизма, составляет $\sim 100 \text{ см}^{-1}$ [20], что позволяет рассматривать делокализованные возбужденные состояния пигментов в терминах теории экситонов [42]. Величина экситонного взаимодействия димеров в тетрамере WSCP, рассчитанная на основе рентгеновской структуры комплекса, составляет всего 10 см^{-1} [13], что позволяет описывать перенос энергии между димерами в рамках теории Förster [52].

Измерение абсорбционной динамики белков WSCP подклассов IIa (BoWSCP, из *Brassica oleracea*) и IIb (LvWSCP, из *Lepidium virginicum*) в фемтосекундном диапазоне проводилось ранее в области полосы Q_y методом двухимпульсной спектроскопии «возбуждение-зондирование» [14] и методом четырехимпульсной 2D-спектроскопии [12, 13]. В работе Theiss et al. [14] измерялись абсорбционные изменения комплекса BoWSCP, содержащего 20–30% $X_l b$, в этой системе был зарегистрирован перенос возбуждения от $X_l b$ к $X_l a$ с характерным временем 400 фс. Данный процесс был отнесен авторами к экситонной релаксации гетеродимера $Chl a - Chl b$, но позднее в работе Alster et al. [12] было показано, что экситонная релаксация гетеродимера происходит быстрее 100 фс, а процессы со временем 250–400 фс относятся к переносу энергии между димерами. В работе Fresch et al. [13] методом 2D-спектроскопии изучалась абсорбционная динамика гомотетрамеров LvWSCP и BoWSCP, содержащих 100% $X_l a$. В обеих системах в субпикосекундном диапазоне наблюдалась моноэкспоненциальная абсорбционная динамика со временем 70 и 100 фс соответственно, которая была интерпретирована как релаксационный переход $E_1 \rightarrow E_2$ в нижнее экситонное состояние [13]. Расчеты в рамках модифицированной теории Редфилда предсказывают, что установление равновесия между экситонными состояниями должно происходить в этом временном диапазоне [15]. Спектральный переход со временем 110 фс, наблюдаемый при возбуждении BoWSCP импульсом 670 нм (рис. 6, а; спектр 2), хорошо соответствует полученным ранее данным.

В данной работе впервые проведены измерения абсорбционной динамики тетрамерного комплекса $X_l a$ в широком спектральном диапазоне 400–750 нм с временным разрешением 20 фс, что позволило в одной экспериментальной системе зарегистрировать процессы внутримолекулярной конверсии $X_l a$ из возбужденного состояния S_3 в состояние S_1 , проанализировать релаксационную динамику экситонно-сопряженных молекул $X_l a$ и количественно характеризовать распределение

экситонных состояний E_1 и E_2 , относящихся к возбужденному состоянию S_1 димера Хл *a*.

Количественное сопоставление абсорбционной динамики в областях Core и полосы Q_y требуется для интерпретации данных, полученных при изучении больших фотосинтетических комплексов. Например, амплитуда выцветания Хл *a* в области полосы Q_y в начальных переходных спектрах фотосистемы I цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* при возбуждении в дальней красной области [53], а также Хл *a* и Хл *f* в аналогичных спектрах фотосистемы I цианобактерии *Fischerella thermalis* PCC 7521 [54] в 3–6 раз превышает амплитуду выцветания полосы Core, тогда как в аналогичных спектрах фотосистемы I цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 амплитуда выцветания полосы Q_y лишь незначительно превышает амплитуду полосы Core [55]. Van Stokkum et al. [56] предположили, что завышенная амплитуда полосы Q_y в начальных спектрах фотосистемы I свидетельствует о тушении большей части возбужденных состояний окисленным хлорофиллом специальной пары. Однако фотособирающие антенные комплексы фотосистемы I цианобактерий *T. elongatus* и *F. thermalis* PCC 7521, в отличие от антенны *Synechocystis* sp. PCC 6803, содержат экситонно-сопряженные димеры и тримеры Хл с максимумом поглощения в дальней красной области [57–60]. Результаты, полученные в данной работе о влиянии экситонного сопряжения на амплитуду выцветания полосы Q_y (рис. 8), позволяют объяснить наблюдаемые эффекты структурными особенностями фотособирающих антенных комплексов.

Из представленных на рис. 8 зависимостей амплитуды выцветания полосы Core и полосы Q_y , а также фактора n_{excited} , представляющего собой оценку количества экситонно-сопряженных молекул Хл, следует несколько выводов о физико-химических свойствах возбужденных состояний BoWSCP.

1. При возбуждении BoWSCP в области Q_y образуется преимущественно верхнее экситонное состояние E_1 с максимумом около 672 нм. Тепловое равновесие между состоянием E_1 и более низким по энергии возбуждения состоянием E_2 (максимум около 684 нм) устанавливается с характерным временем $\tau_1 = 105 \pm 10$ фс; однако состояние E_1 остается преобладающим на временах сотен пикосекунд (его относительный вклад уменьшается до ~80%). Инверсию заселенности можно объяснить существенным вкладом энтропии в разницу свободных энергий состояний E_1 и E_2 . Это, в свою очередь, означает сильное электронное

взаимодействие мономеров в BoWSCP, возникающее при существенном перекрывании волновых функций возбужденных состояний. В подобных димерах возникают резонансные состояния с переносом заряда, поэтому для них характерна высокая энергия электрон-фононного сопряжения [61, 62].

2. При возбуждении BoWSCP в области полосы Core образуется преимущественно электронное состояние S_3 (обозначаемое так же, как B_x), которое переходит в состояние S_1 в процессе внутримолекулярной конверсии с характерным временем 83 ± 9 фс. Однако стимулированное излучение в этом состоянии характеризуется примерно вдвое меньшей амплитудой в сравнении с равновесным состоянием, образующимся после возбуждения на 670 нм. Уменьшение амплитуды стимулированного излучения может возникать в результате сверхбыстрой фотохимической реакции окисления Хл и восстановления одного из остатков триптофана, которая конкурирует с реакцией внутримолекулярной конверсии. В этом случае обратная реакция рекомбинации ион-радикальной пары Chl^+Trp^- может происходить медленнее 200 пс. Реакция фотовосстановления триптофана $\text{Chl}^* \rightarrow \text{Chl}^+\text{Trp}^-$ была зарегистрирована при исследовании LvWSCP методами спектроскопии выжигания провалов при температуре 4 К в часовом временном интервале с малым квантовым выходом [47]. Можно предположить, что спектральные изменения с характерным временем $\tau_2 = 16 \pm 3$ пс (рис. 6, б) могут возникать в результате ускорения данной фотохимической реакции при температуре 279 К.

3. Увеличение амплитуды выцветания полосы Q_y относительно полосы Core наблюдалось в переходных спектрах фотосистемы I различных цианобактерий при специфическом возбуждении длинноволновых форм хлорофилла [53, 54, 63]. Возникновение длинноволновых форм хлорофилла в светособирающей фотосинтетической антенне и реакционном центре фотосистемы I связано с образованием димерных и тримерных экситонно-сопряженных комплексов [60, 64, 65], что имеет очевидную структурную аналогию с организацией молекул хлорофилла в комплексе WSCP.

Вклад авторов. Д.А. Черепанов — анализ результатов спектральных измерений; К.В. Неверов, Ю.Н. Обухов, Ю.В. Малеева — производство, выделение и биохимическая характеристика препаратов BoWSCP; Ф.Е. Гостев, И.В. Шелаев, А.В. Айбуш — разработка математического аппарата, методики и проведение

фемтосекундных измерений; М.С. Крицкий, В.А. Надточенко — концепция работы. Все авторы внесли значительный вклад в написание рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20155).

Благодарности. Авторы благодарят А.Л. Добрякова за помощь в разработке метода аппроксимации когерентного артефакта и установления аппаратной функции фемтосекундной установки. В работе использовано оборудование (фемтосекундная установка) Центра коллективного пользования ФИЦ ХФ РАН «Анализ химических, биологических систем и

природных материалов: масс-спектральная микроскопия и фемтосекундная лазерная микроскопия-спектроскопия» (рег. номер: 506694). Экспрессионный вектор pET-24b со встроенным геном белка WoWSCP был любезно предоставлен проф. Харальдом Паульсеном (Институт молекулярной физиологии Университета Иоганна Гутенберга, Майнц, Германия).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Charlton, A., and Zachariou, M. (2007) Immobilized metal ion affinity chromatography of histidine-tagged fusion proteins, *Methods Mol. Biol.*, **421**, 137-149, doi: 10.1007/978-1-59745-582-4_10.
2. Cherepanov, D. A., Semenov, A. Y., Mamedov, M. D., Aybush, A. V., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Shuvalov, V. A., and Nadtochenko, V. A. (2022) Current state of the primary charge separation mechanism in photosystem I of cyanobacteria, *Biophys. Rev.*, **14**, 805-820, doi: 10.1007/s12551-022-00983-1.
3. Murata, T., Toda, F., Uchino, K., and Yakushiji, E. (1971) Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea* var. botrys (cauliflower), *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **245**, 208-215, doi: 10.1016/0005-2728(71)90023-5.
4. Satoh, H., Nakayama, K., and Okada, M. (1998) Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll protein, a putative carrier of chlorophyll molecules in cauliflower, *J. Biol. Chem.*, **273**, 30568-30575, doi: 10.1074/jbc.273.46.30568.
5. Takahashi, S., Yanai, H., Nakamaru, Y., Uchida, A., Nakayama, K., and Satoh, H. (2012) Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble chl-binding protein from brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. gemmifera), *Plant Cell Physiol.*, **53**, 879-891, doi: 10.1093/pcp/pcs031.
6. Takahashi, S., Yanai, H., Oka-Takayama, Y., Zanma-Sohtome, A., Fujiyama, K., Uchida, A., Nakayama, K., and Satoh, H. (2013) Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) from Virginia pepperweed (*Lepidium virginicum*), a unique WSCP that preferentially binds chlorophyll *b* *in vitro*, *Planta*, **238**, 1065-1080, doi: 10.1007/s00425-013-1952-7.
7. Satoh, H., Uchida, A., Nakayama, K., and Okada, M. (2001) Water-soluble chlorophyll protein in Brassicaceae plants is a stress-induced chlorophyll-binding protein, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 906-911, doi: 10.1093/pcp/pce117.
8. Horigome, D., Satoh, H., Itoh, N., Mitsunaga, K., Oonishi, I., Nakagawa, A., and Uchida, A. (2007) Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **282**, 6525-6531, doi: 10.1074/jbc.M609458200.
9. Малеева Ю. В., Неверов К. В., Обухов Ю. Н., Крицкий М. С. (2019) Водорастворимые хлорофиллсвязывающие белки растений: структура, свойства и функции, *Мол. Биол.*, **53**, 998-1011, doi: 10.1134/S0026898419060120.
10. Schmitt, F. J., Trostmann, I., Theiss, C., Pieper, J., Renger, T., Fuesers, J., Hubrich, E. H., Paulsen, H., Eichler, H. J., and Renger, G. (2008) Excited state dynamics in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower investigated by transient fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13951-13961, doi: 10.1021/jp8024057.
11. Renger, G., Pieper, J., Theiss, C., Trostmann, I., Paulsen, H., Renger, T., Eichler, H. J., and Schmitt, F. J. (2011) Water soluble chlorophyll binding protein of higher plants: A most suitable model system for basic analyses of pigment-pigment and pigment-protein interactions in chlorophyll protein complexes, *J. Plant Physiol.*, **168**, 1462-1472, doi: 10.1016/j.jplph.2010.12.005.
12. Alster, J., Lokstein, H., Dostál, J., Uchida, A., and Zigmantas, D. (2014) 2D spectroscopy study of water-soluble chlorophyll-binding protein from lepidium virginicum, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 3524-3531, doi: 10.1021/jp411174t.
13. Fresch, E., Meneghin, E., Agostini, A., Paulsen, H., Carbonera, D., and Collini, E. (2020) How the protein environment can tune the energy, the coupling, and

- the ultrafast dynamics of interacting chlorophylls: the example of the water-soluble chlorophyll protein, *J. Phys. Chem. Lett.*, **11**, 1059-1067, doi: 10.1021/acs.jpclett.9b03628.
14. Theiss, C., Trostmann, I., Andree, S., Schmitt, F. J., Renger, T., Eichler, H. J., Paulsen, H., and Renger, G. (2007) Pigment–pigment and pigment–protein interactions in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 13325-13335, doi: 10.1021/jp0723968.
 15. Renger, T., Trostmann, I., Theiss, C., Madjet, M. E., Richter, M., Paulsen, H., Eichler, H. J., Knorr, A., and Renger, G. (2007) Refinement of a structural model of a pigment–protein complex by accurate optical line shape theory and experiments, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10487-10501, doi: 10.1021/jp0717241.
 16. Friedl, C., Fedorov, D. G., and Renger, T. (2022) Towards a quantitative description of excitonic couplings in photosynthetic pigment-protein complexes: Quantum chemistry driven multiscale approaches, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **24**, 5014-5038, doi: 10.1039/d1cp03566e.
 17. Lahav, Y., Noy, D., and Schapiro, I. (2021) Spectral tuning of chlorophylls in proteins – electrostatics vs. ring deformation, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **23**, 6544-6551, doi: 10.1039/d0cp06582j.
 18. Agostini, A., Meneghin, E., Gewehr, L., Pedron, D., Palm, D. M., Carbonera, D., Paulsen, H., Jaenicke, E., and Collini, E. (2019) How water-mediated hydrogen bonds affect chlorophyll *a/b* selectivity in water-soluble chlorophyll protein, *Sci. Rep.*, **9**, 1-10, doi: 10.1038/s41598-019-54520-54524.
 19. Bednarczyk, D., Dym, O., Prabakar, V., Peleg, Y., Pike, D. H., and Noy, D. (2016) Fine tuning of chlorophyll spectra by protein-induced ring deformation, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **55**, 6901-6905, doi: 10.1002/anie.201512001.
 20. Hughes, J. L., Razeghifard, R., Logue, M., Oakley, A., Wydrzynski, T., and Krausz, E. (2006) Magneto-optic spectroscopy of a protein tetramer binding two exciton-coupled chlorophylls, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3649-3658, doi: 10.1021/ja056576b.
 21. Обухов Ю. Н., Неверов К. В., Малеева Ю. В., Крицкий М. С. (2023) Димеры хлорофилла *a* в составе водорастворимого белка BoWSCP фотосенсибилизируют восстановление цитохрома *c*, *Докл. Акад. Наук*, **509**, 191-195, doi: 10.31857/S2686738922600790.
 22. Takahashi, S., Uchida, A., Nakayama, K., and Satoh, H. (2014) Three-step photoconversion of only three subunits of the water-soluble chlorophyll-binding protein tetramer from *Chenopodium album*, *Protein J.*, **33**, 337-343, doi: 10.1007/s10930-014-9565-y.
 23. Kelly, S. M., Jess, T. J., and Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1751**, 119-139, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
 24. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
 25. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Petrova, A. A., Aybush, A. V., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Nadochenko, V. A. (2017) Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the Q Y band, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1858**, 895-905, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.008.
 26. Dobryakov, A. L., Pérez Lustres, J. L., Kovalenko, S. A., and Ernstring, N. P. (2008) Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications, *Chem. Phys.*, **347**, 127-138, doi: 10.1016/j.chemphys.2007.11.003.
 27. Golubeva, E. N., Zubanova, E. M., Melnikov, M. Y., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., and Nadochenko, V. A. (2014) Femtosecond spectroscopy and TD-DFT calculations of CuCl₄²⁻ excited states, *Dalt. Trans.*, **43**, 17820-17827, doi: 10.1039/C4DT01409J.
 28. Dobryakov, A. L., Kovalenko, S. A., Weigel, A., Pérez Lustres, J. L., Lange, J., Müller, A., and Ernstring, N. P. (2010) Femtosecond pump/supercontinuum-probe spectroscopy: Optimized setup and signal analysis for single-shot spectral referencing, *Rev. Sci. Instrum.*, **81**, 113106, doi: 10.1063/1.3492897.
 29. Kovalenko, S. A., Dobryakov, A. L., Ruthmann, J., and Ernstring, N. P. (1999) Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing, *Phys. Rev. A At. Mol. Opt. Phys.*, **59**, 2369-2384, doi: 10.1103/PhysRevA.59.2369.
 30. Šimůnek, J., and Hopmans, J. W. (2002) 1.7 parameter optimization and nonlinear fitting, *Methods Soil Anal. Part 4 Phys. Methods*, **5**, 139-157, doi: 10.2136/sssabookser5.4.c7.
 31. Clementson, L. A., and Wojtasiewicz, B. (2019) Dataset on the absorption characteristics of extracted phytoplankton pigments, *Data Br.*, **24**, 103875, doi: 10.1016/j.dib.2019.103875.
 32. Sirohiwal, A., Berraud-Pache, R., Neese, F., Izsák, R., and Pantazis, D. A. (2020) Accurate computation of the absorption spectrum of chlorophyll *a* with pair natural orbital coupled cluster methods, *J. Phys. Chem. B*, **124**, 8761-8771, doi: 10.1021/acs.jpcb.0c05761.
 33. Gouterman, M. (1961) Spectra of porphyrins, *J. Mol. Spectrosc.*, **6**, 138-163, doi: 10.1016/0022-2852(61)90236-3.
 34. Bricker, W. P., Shenai, P. M., Ghosh, A., Liu, Z., Enriquez, M. G. M., Lambrev, P. H., Tan, H. S., Lo, C. S., Tretiak, S., Fernandez-Alberti, S., and Zhao, Y. (2015) Non-radiative relaxation of photoexcited chlorophylls: theoretical and experimental study, *Sci. Rep.*, **5**, 1-16, doi: 10.1038/srep13625.

35. Götze, J. P., Anders, F., Petry, S., Witte, J. F., and Lokstein, H. (2022) Spectral characterization of the main pigments in the plant photosynthetic apparatus by theory and experiment, *Chem. Phys.*, **559**, 111517, doi: 10.1016/j.chemphys.2022.111517.
36. Umetsu, M., Wang, Z. Y., Kobayashi, M., and Nozawa, T. (1999) Interaction of photosynthetic pigments with various organic solvents. Magnetic circular dichroism approach and application to chlorosomes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1410**, 19-31, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00170-4.
37. Shipman, L. L., Cotton, T. M., Norris, J. R., and Katz, J. J. (1976) An analysis of the visible absorption spectrum of chlorophyll *a* monomer, dimer, and oligomers in solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 8222-8230, doi: 10.1021/ja00441a056.
38. Черепанов Д. А., Милановский Г. Е., Айбуш А. В., Надточенко В. А. (2023) Дипольный момент перехода S₀→S₁ хлорофилла *a* в растворителях с различным индексом рефракции, *Хим. Физ.*, **42**, 77-78, doi: 10.31857/S0207401X23060031.
39. Berera, R., Van Grondelle, R., and Kennis, J. T. M. (2009) Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems, *Photosynth. Res.*, **101**, 105-118, doi: 10.1007/s11120-009-9454-y.
40. Черепанов Д. А., Гостев Ф. Е., Шелаев И. В., Айбуш А. В., Семенов А. Ю., Мамедов М. Д., Шувалов В. А., Надточенко В. А. (2020) Абсорбционный спектр возбужденного синглетного состояния хлорофилла *a* в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах, *Хим. Выс. Энерг.*, **54**, 158-160, doi: 10.31857/S0023119320020059.
41. Cherepanov, D. A., Petrova, A. A., Mamedov, M. D., Vishnevskaya, A. I., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Aybush, A. V., and Nadtochenko, V. A. (2022) Comparative absorption dynamics of the singlet excited states of chlorophylls *a* and *d*, *Biochem.*, **87**, 1179-1186, doi: 10.1134/S000629792210011X.
42. Davydov, A. S. (1962) *The Theory Of Molecular Excitons*, McGraw-Hill, New York, NY.
43. Kasha, M., Rawls, H. R., and El-Bayoumi, M. A. (1965) The exciton model in molecular spectroscopy, *Pure Appl. Chem.*, **11**, 371-392, doi: 10.1351/pac196511030371.
44. Scholes, G. D., and Ghiggino, K. P. (1994) Rate expressions for excitation transfer I. Radiationless transition theory perspective, *J. Chem. Phys.*, **101**, 1251-1261, doi: 10.1063/1.467817.
45. Renger, T., and Marcus, R. A. (2002) On the relation of protein dynamics and exciton relaxation in pigment-protein complexes: an estimation of the spectral density and a theory for the calculation of optical spectra, *J. Chem. Phys.*, **116**, 9997-10019, doi: 10.1063/1.1470200.
46. Pieper, J., Rätsep, M., Trostmann, I., Schmitt, F. J., Theiss, C., Paulsen, H., Eichler, H. J., Freiberg, A., and Renger, G. (2011) Excitonic energy level structure and pigment-protein interactions in the recombinant water-soluble chlorophyll protein. II. Spectral hole-burning experiments, *J. Phys. Chem. B*, **115**, 4053-4065, doi: 10.1021/jp111457t.
47. Kell, A., Bednarczyk, D., Acharya, K., Chen, J., Noy, D., and Jankowiak, R. (2016) New insight into the water-soluble chlorophyll-binding protein from *Lepidium virginicum*, *Photochem. Photobiol.*, **92**, 428-435, doi: 10.1111/php.12581.
48. Adolphs, J., Berrér, M., and Renger, T. (2016) Hole-burning spectroscopy on excitonically coupled pigments in proteins: theory meets experiment, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 2993-3001, doi: 10.1021/jacs.5b08246.
49. Gillie, J. K., Lyle, P. A., Small, G. J., and Golbeck, J. H. (1989) Spectral hole burning of the primary electron donor state of Photosystem I, *Photosynth. Res.*, **22**, 233-246, doi: 10.1007/BF00048302.
50. Pieper, J., Voigt, J., and Small, G. J. (1999) Chlorophyll *a* Franck-Condon factors and excitation energy transfer, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2321-2322, doi: 10.1021/jp984460e.
51. Peternian, E. J. G., Pullerits, T., van Grondelle, R., and van Amerongen, H. (1997) Electron-phonon coupling and vibronic fine structure of light-harvesting complex II of green plants: temperature dependent absorption and high-resolution fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 4448-4457, doi: 10.1021/jp962338e.
52. Förster, T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence [in German], *Ann. Phys.*, **437**, 55-75, doi: 10.1002/andp.19484370105.
53. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Mamedov, M. D., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Nadtochenko, V. A. (2020) Generation of ion-radical chlorophyll states in the light-harvesting antenna and the reaction center of cyanobacterial photosystem I, *Photosynth. Res.*, **146**, 55-73, doi: 10.1007/s11120-020-00731-0.
54. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Mamedov, M. D., Shen, G., Nadtochenko, V. A., Bryant, D. A., Semenov, A. Y., and Golbeck, J. H. (2020) Evidence that chlorophyll *f* functions solely as an antenna pigment in far-red-light photosystem I from *Fischerella thermalis* PCC 7521, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148184.
55. Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Sarkisov, O. M., Nadtochenko, V. A., Shuvalov, V. A., and Semenov, A. Y. (2010) Femtosecond primary charge separation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1797**, 1410-1420, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.026.
56. Van Stokkum, I. H. M., Müller, M. G., Weißenborn, J., Weigand, S., Snellenburg, J. J., and Holzwarth, A. R. (2023) Energy transfer and trapping in photosystem I with and without chlorophyll-*f*, *IScience*, **26**, 107650, doi: 10.1016/J.ISCI.2023.107650.

57. Pålsson, L.-O. O., Flemming, C., Gobets, B., van Grondelle, R., Dekker, J. P., and Schlodder, E. (1998) Energy transfer and charge separation in photosystem I: P700 oxidation upon selective excitation of the long-wavelength antenna chlorophylls of *Synechococcus elongatus*, *Biophys. J.*, **74**, 2611-2622, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77967-6.
58. Gobets, B., Kennis, J. T. M., Ihalainen, J. A., Brazzoli, M., Croce, R., Stokkum, I. H. M. van, Bassi, R., Dekker, J. P., van Amerongen, H., Fleming, G. R., and van Grondelle, R. (2001) Excitation energy transfer in dimeric light harvesting complex I: a combined streak-camera/fluorescence upconversion study, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 10132-10139, doi: 10.1021/jp011901c.
59. Riley, K. J., Reinot, T., Jankowiak, R., Fromme, P., and Zazubovich, V. (2007) Red antenna states of photosystem I from cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Thermosynechococcus elongatus*: single-complex spectroscopy and spectral hole-burning study, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 286-292, doi: 10.1021/jp062664m.
60. Gisriel, C., Shen, G., Kurashov, V., Ho, M. Y., Zhang, S., Williams, D., Golbeck, J. H., Fromme, P., and Bryant, D. A. (2020) The structure of Photosystem I acclimated to far-red light illuminates an ecologically important acclimation process in photosynthesis, *Sci. Adv.*, **6**, eaay6415, doi: 10.1126/sciadv.aay6415.
61. Young, R. M., and Wasielewski, M. R. (2020) Mixed electronic states in molecular dimers: Connecting singlet fission, excimer formation, and symmetry-breaking charge transfer, *Acc. Chem. Res.*, **53**, 1957-1968, doi: 10.1021/acs.accounts.0c00397.
62. Casanova, D. (2018) Theoretical modeling of singlet fission, *Chem. Rev.*, **118**, 7164-7207, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00601.
63. Petrova, A. A., Casazza, A. P., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Nadtochenko, V. A., Semenov, A. Y., Santabarbara, S., and Cherepanov, D. A. (2023) Role of pheophytin a in the primary charge separation of photosystem I from *Acaryochloris marina*: femtosecond optical studies of excitation energy and electron transfer reactions, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1864**, 148984, doi: 10.1016/j.bbambio.2023.148984.
64. Akhtar, P., and Lambrev, P. H. (2020) On the spectral properties and excitation dynamics of long-wavelength chlorophylls in higher-plant photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148274, doi: 10.1016/J.BBADIO.2020.148274.
65. Karapetyan, N. V., Bolychevtseva, Y. V., Yurina, N. P., Terekhova, I. V., Shubin, V. V., and Brecht, M. (2014) Long-wavelength chlorophylls in photosystem I of cyanobacteria: origin, localization, and functions, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 213-220, doi: 10.1134/S0006297914030067.

PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF CHLOROPHYLL TETRAMER IN WATER-SOLUBLE CHLOROPHYLL-BINDING PROTEIN BoWSCP

D. A. Cherepanov^{1,2*}, K. V. Neverov^{3,4}, Yu. N. Obukhov³, Yu. V. Maleeva⁴, F. E. Gostev¹, I. V. Shelaev^{1,2}, A. V. Aybush¹, M. S. Kritsky³, and V. A. Nadtochenko^{1,5*}

¹ Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: tscherepanov@gmail.com

² Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

³ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁵ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nadtochenko@gmail.com

The absorption dynamics of chlorophyll *a* in a symmetric tetrameric complex of the water-soluble chlorophyll-binding protein BoWSCP was measured by the broadband femtosecond laser pump-probe spectroscopy within the range from 400 to 780 nm with a time resolution of 20 f-200 ps. When BoWSCP was excited in the region of the Soret band at a wavelength of 430 nm, a nonradiative intramolecular conversion $S_3 \rightarrow S_1$ was observed with a characteristic time of 83 ± 9 fs. When the complex was excited in the region of the Q_y band at a wavelength of 670 nm, a relaxation transition between two excitonic states of the chlorophyll dimer was observed with a time of 105 ± 10 fs. Absorption spectra of excited singlet states S_1 and S_3 of chlorophyll *a* were obtained. It has been demonstrated that the delocalization of the excited state between exciton-coupled Chl molecules in the BoWSCP tetramer changes in time and depends on the excitation energy. Upon excitation of BoWSCP, an ultrafast photochemical reaction is observed in the Soret region, apparently due to the reduction of tryptophan in the vicinity of chlorophyll.

Keywords: chlorophyll *a*, proteins from the WSCP family, femtosecond laser spectroscopy, excited state spectrum, exciton dynamics, intramolecular conversion